

RO/KR 08.10.2002
REC'D 08 NOV 2002
WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

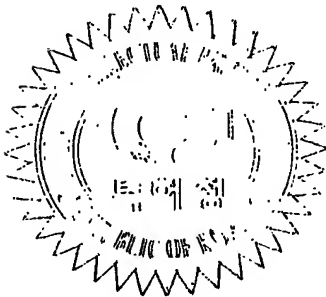
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0048277
Application Number PATENT-2002-0048277

출원 년 월 일 : 2002년 08월 14일
Date of Application AUG 14, 2002

출원 인 : 김태윤
Applicant(s) KIM TAE YOON

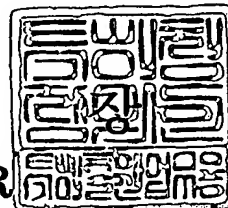
BEST AVAILABLE COPY



2002 년 10 월 08 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.08.14
【발명의 명칭】	피토스핑고신 유도체를 함유하는 아포토시스 유도용 조성물
【발명의 영문명칭】	A composition comprising phytospingosine derivatives for apoptosis induction
【출원인】	
【성명】	김태운
【출원인코드】	4-2000-001156-2
【대리인】	
【성명】	박승문
【대리인코드】	9-1999-000536-0
【포괄위임등록번호】	2002-061058-1
【대리인】	
【성명】	조용식
【대리인코드】	9-1999-000634-5
【포괄위임등록번호】	2002-061059-9
【대리인】	
【성명】	안소영
【대리인코드】	9-2000-000155-5
【포괄위임등록번호】	2002-061062-6
【발명자】	
【성명】	김태운
【출원인코드】	4-2000-001156-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김혜정
【성명의 영문표기】	KIM,Hye Jung
【주민등록번호】	730403-2548013
【우편번호】	137-701

【주소】 서울특별시 서초구 반포4동 가톨릭대학교 의과학연구원 4층 피부과연 구실
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
 박승문 (인) 대리인
 조용식 (인) 대리인
 안소영 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 7 면 7,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 14 항 557,000 원
【합계】 593,000 원
【감면사유】 개인 (70%감면)
【감면후 수수료】 177,900 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 피토스핑고신 유도체를 유효성분으로 함유하는 아폽토시스 유도용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 아폽토시스 유도 활성을 갖는 약학 조성물 또는 화장료 조성물을 포함한다.

본 발명의 조성물은 생체내 아폽토시스 활성 유도에 의해 예방 또는 치료가 가능한 각종 피부질환, 각종 종양, 각종 암 등의 예방 또는 치료에 유용하다.

또한 본 발명의 조성물은 비타민 D₃ 또는 칼시포트리올(calcipotriol)의 병용투여에 의해 상승 효과를 나타낸다.

【대표도】

도 1

【명세서】**【발명의 명칭】**

피토스핑고신 유도체를 함유하는 아폽토시스 유도용 조성물{A composition comprising phytosphingosine derivatives for apoptosis induction}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 조성물의 유효성분인 피토스핑고신 유도체의 농도(1~30 μ M)에 따른 세포독성 효과를 나타낸 도이다.

도 2는 TUNEL assay에 의해 본 발명의 조성물의 유효성분인 피토스핑고신 유도체의 아폽토시스 효과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 조성물의 유효성분인 피토스핑고신 유도체 중 NAPS와 TAPS 30 μ M 농도에서의 시간에 따른 아폽토시스 유도 효과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 조성물의 유효성분인 피토스핑고신 유도체 중 TAPS가 세포주기에 미치는 효과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 조성물의 유효성분인 피토스핑고신 유도체 중 TAPS 처리에 의한 HaCaT 세포에서의 체세포분열(mitosis)을 관찰한 도이다.

도 6은 본 발명의 조성물의 유효성분인 피토스핑고신 유도체 중 TAPS를 30 μ M의 농도로 24시간 처리하여 mRNA를 분리한 후 apoptosis array kit를 이용하여 아폽토시스에 관여하는 유전자를 관찰한 도이다.

도 7는 본 발명의 조성물의 유효성분인 피토스펑고신 유도체 중 NAPS, TAPS 및 C2-세라마이드가 DNA를 분해하여 아폽토시스를 유도하는 효소인 카스파제-3의 발현 유도에 미치는 영향을 시간대별로 관찰한 도이다.

도 8는 본 발명의 조성물의 유효성분인 피토스펑고신 유도체 중 TAPS 처리에 의한 HaCaT 세포에서의 p53과 Chk1 단백질의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 9은 본 발명의 조성물의 유효성분인 피토스펑고신 유도체 중 NAPS와 TAPS 처리에 의한 HaCaT 세포에서의 Chk1 단백질의 발현 정도를 나타낸 도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <10> 본 발명은 피토스펑고신 유도체를 함유하는 아폽토시스 유도용 조성물에 관한 것이다.
- <11> 아폽토시스(Apoptosis)는 예정된 세포사(programmed cell death)를 의미하는 것으로서 생리 및 병리적 상황에서 일어나는 세포 사멸의 한 형태이다.
- <12> 생체내 정상 세포 조직에서는 세포의 증식과 아폽토시스가 균형을 이루어 조직의 세포수가 일정하게 유지되는 반면, 종양 세포 조직에서는 급속한 세포증식에 비해 아폽토시스가 적절히 이루어지지 못하기 때문에 세포수가 일방적으로 증가되어 암세포의 증식이 일어나는 것으로 알려져 있다(Raff.M.C., Nature, 356:397, 1992). 아폽토시스 유도에 관련된 인자로는 p53, bcl-2, bcl-XL, 카스파제(caspase) 등이 알려져 있으며(Wyllie,A., Nature, 389:237, 1997), 아폽토시스 프로그램이 활성화되면, 세포막의 수

포(blebbing), 뉴클레아제(nuclease)에 의한 염색체의 DNA 분해, DNA 응축(condensation) 및 분절(fragmentation)이 일어난다.

- <13> 아폽토시스는 태아의 발생과정, 피부, 내장기관, 면역기관의 기능에 중요한 역할을 한다.
- <14> 아폽토시스와 관련된 피부질환중 특히 건선(psoriasis)은 각질세포의 이상증식, 다양한 염증성 세포, 특히 T 세포가 침윤(infiltration) 되어 있고 활성화되어 있는 질환이다. 건선은 특히 혈관신생(angiogenesis)과 함께 피부각질형성 세포를 빠르게 증식시키므로 이러한 피부각질형성 세포에 아폽토시스를 유도하는 제제가 효과적인 치료약으로 제시되어 왔다.
- <15> 한편 스핑고리피드 (sphingolipid) 유도체인 세라마이드는 종양괴사인자- α (TNF- α), 인터루킨-1 (IL-1), 인터페론- γ (INF- γ), FAS 리간드 (ligand) 및 방사선 조사와 같은 자극들에 의해 활성화된 SMase (sphingomyelinase)가 스핑고마이에린(sphingomyelin)을 분해시켜 생성된 산물로서 세포내 신호전달매개물질로 작용하여 세포 분화(cell differentiation), 세포주기 저지(cell cycle arrest), 증식(proliferation) 및 아폽토시스 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- <16> 피토스핑고신은 세라마이드와 마찬가지로 피부 보호, 피부 건조 방지 등의 효능을 나타낼 뿐 아니라, 다양한 미생물에 의해 생산되어 천연원료 확보가 용이하다. 또한 세라마이드와는 달리 피부 진피층에까지 침투하는 것으로 보고되어 각종 피부질환에 대한 유용성이 밝혀지고 있다.

<17> 본 발명자들은 아폽토시스 활성 유도에 의해 예방 또는 치료 효과가 나타나는 각종 질병에 유효한 물질을 찾던 중 특정한 피토스핑고신 유도체에서 아폽토시스 유도 효과가 현저하게 나타남을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<18> 본 발명에서는 피토스핑고신 유도체를 유효성분으로 하는 아폽토시스 유도용 조성물을 제공하고자 한다.

【발명의 구성 및 작용】

<19> 본 발명은 피토스핑고신 유도체를 유효성분으로 함유하는 아폽토시스 유도용 조성물을 제공한다.

<20> 본 발명의 조성물은 아폽토시스 유도 활성을 갖는 약학 조성물 또는 화장품 조성물을 포함한다.

<21> 본 발명의 조성물에 함유되는 피토스핑고신 유도체는 효모로부터 생산하여 순수 정제한 피토스핑고신(phytosphingosine, PS), 피토스핑고신-HCl(PS-HCl), C6-피토스핑고신(C6-PS), CLA-피토스핑고신(CLA-PS), 테트라아세틸 피토스핑고신(TAPS) 및 N-아세틸 피토스핑고신(NAPS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함한다.

<22> 본 발명의 조성물은 인간 각질형성세포주, 인간 피부상피세포암 세포주 및 사람 제대혈관내피세포에서 모두 세포독성 효과를 나타낸다.

<23> 본 발명의 조성물은 인간 각질형성세포주에서 아폽토시스 효과를 나타내며, 특히 TAPS와 NAPS의 경우 30 μ M에서 현저한 아폽토시스 효과를 나타낸다.

- <24> 본 발명의 조성물에 의한 아포토시스 유도는 체세포 분열 중기(G₂/M) 단계에서 일어난다.
- <25> 본 발명의 조성물은 효과적인 건선 치료제 및 증상 완화제로 사용되고 있는 비타민 D₃ 또는 칼시포트리올과 병용투여에 의해 상승 효과를 나타낸다.
- <26> 본 발명의 조성물에 의한 아포토시스 유도에 관여하는 유전자는 COX-2, PIN, Mcl-1, Bcl-10, IL-1 β , p21 이다.
- <27> 본 발명의 조성물에 의한 아포토시스 유도에 관여하는 단백질은 카스파제-3, p53, Chk1 등이다.
- <28> 본 발명의 조성물을 처리후 3시간에 카스파제-3가 최고로 발현되어, 탁월한 아포토시스 유도능을 가진다.
- <29> 본 발명의 조성물은 생체내 아포토시스 활성 유도에 의해 예방 또는 치료가 가능한 각종 피부질환, 각종 종양, 각종 암 등의 예방 또는 치료에 유용하다.
- <30> 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료가 가능한 질환은 구체적으로 습진, 건선, 어린선 등과 같은 각질이상 질환; 아토피성 피부염, 피부염증, 소양증, 세균감염증, 여드름 또는 창상 등과 같은 피부질환; 자외선에 의해 유발되는 피부노화 및 피부질환; 전립선암, 피부암, 췌장암, 결장암, 흑색종, 난소암, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 자궁암, 유방암, 방광암, 뇌암, 신경세포종/신경교아세포종, 백혈병 등과 같은 많은 종류의 암 및 딱딱한 종양 등이다.
- <31> 특히, 본 발명의 조성물은 건선, 어린선 등과 같은 각질화성 질환, 자외선에 의해 유발되는 피부노화 및 피부질환, 피부암의 예방 또는 치료에 유용하다.

- <32> 본 발명의 조성물은 상기 피토스펩고신 유도체에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- <33> 본 발명의 조성물은 상기 피토스펩고신 유도체에 추가로 다른 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- <34> 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- <35> 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여, 국부 투여, 경구 투여할 수 있으며, 본 발명에서는 비경구 투여, 국부 투여가 바람직하다. 비경구 투여에 대해서, 본 발명의 조성물은 관류 또는 주사용 용액 또는 현탁액 형태일 수 있으며, 국부 투여에 대해서는 피부 및 점막 치료용으로 연고, 크림, 유액, 고약, 파우더, 함침 패드, 용액, 젤, 스프레이, 로션 또는 현탁액 형태로 제공될 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그

범위가 다양하나, 일일 투여량이 1~100mg/kg의 양을 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 바람직하다.

<36> 본 발명의 화장료 조성물중 피토스핑고신 유도체는 화장료 조성물 총 중량에 대해 0.05~10.0 중량부, 바람직하게는 0.1~5.0 중량부로 배합한다.

<37> 본 발명의 화장료 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 아이크림, 영양크림, 맛사지크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 파우더, 에센스, 팩, 유액, 로션, 연고, 젤, 고분자 또는 지질 소포 또는 나노스피어 또는 마이크로스피어, 비누 또는 샴푸 등의 제형을 가질 수 있다. 그리고, 각 제형의 화장료 조성물에 있어서, 피토스핑고신 유도체 외에 다른 성분들은 기타 화장료의 제형 또는 사용목적 등에 따라 당업자가 적의 선정하여 배합할 수 있다.

<38> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

<39> 실시예 1 : 세포독성 측정(MTT assay)

<40> 피토스핑고신(phytosphingosine, PS), 피토스핑고신-HCl(PS-HCl), C6-피토스핑고신(C6-PS), CLA-피토스핑고신 (CLA-PS), 테트라아세틸 피토스핑고신 (TAPS) 및 N-아세틸 피토스핑고신(NAPS)을 DMSO에 용해하여 최종 1~30 μ M 농도로 사용하였다.

<41> 1. 본 발명의 조성물이 인간 각질형성 세포주인 HaCaT 세포에서 세포독성에 미치는 영향

<42> 본 발명의 조성물이 인간 각질형성 세포주(Human keratinocyte cell line)인 HaCaT 세포에서 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 사용하여 세포 생존률(cell viability)을 분석하였다.

<43> HaCaT 세포는 100mm 디쉬에 1×10^6 의 개수로 접종(seeding) 한 후, 10% 우태아혈청(FBS, GIBCO), 100 units/ml 페니실린, 100mg/ml 스트렙토마이신이 함유된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에서 48시간 동안 배양하였다. 트립신을 처리하여 다시 96 웰 플레이트에 웰당 $1-2 \times 10^4$ 개의 세포를 세럼 없는 배지를 이용하여 접종한 후, 약 3시간 후에 스펅고신 유도체들을 처리하여 배양하였다. 24시간 배양후 MTT 시약을 2mg/ml의 농도로 넣고 4시간 동안 배양한 후, 배지를 완전히 제거하고 DMSO에 현탁시켜 540nm에서 O.D.를 측정하였다.

<44> 비교물질로는 C2-세라마이드를 사용하였다.

<45> 측정 결과는 표 1 및 도 1에 나타내었다.

<46> 【표 1】

피토스펙고신 유도체의 농도(1-30 μ M)에 따른 세포생존률

	PS	PS-HCl	C6-PS	CLA-PS	NAPS	TAPS	C2-세라마이드
con	100 \pm 6.2	100 \pm 9.6	100 \pm 7.3	100 \pm 0.6	100 \pm 8.6	100 \pm 1.2	100 \pm 2.0
1 μ M	97 \pm 1.1	100 \pm 4.1	84 \pm 6.8	66 \pm 7.8	103 \pm 6.9	94 \pm 0.1	97 \pm 3.8
3 μ M	93 \pm 3	101 \pm 2.2	96 \pm 7.2	64 \pm 9.9	99 \pm 3.5	93 \pm 2.9	98 \pm 2.5
10 μ M	86 \pm 0.1	79 \pm 7.0	74 \pm 0.1	58 \pm 0.4	86 \pm 2.1	76 \pm 1.4	75 \pm 1.3
30 μ M	51 \pm 9.6	36 \pm 6.8	87 \pm 1.3	55 \pm 9.1	17 \pm 0.8	17 \pm 1.1	33 \pm 0.6

<47> 표 1과 도 1에 나타난 바와 같이, 6 종류의 피토스핑고신 유도체 모두 세포증식을 억제하였다. 특히 30 μ M에서 NAPS 및 TAPS는 각각 83%의 세포독성을 나타낸 반면 C2-세라마이드는 67%의 세포독성을 나타내어 NAPS 및 TAPS가 C2-세라마이드 보다 16%의 우수한 세포독성효과가 있음을 알 수 있다.

<48> 2. 본 발명의 조성물이 인간 피부상피세포암 세포주인 A431 세포에서 세포독성에 미치는 영향

<49> 본 발명의 조성물이 인간 피부상피세포암 세포주인 A431 세포에서 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 이용하여 관찰하였다.

<50> 세포배양 방법 및 MTT assay 방법은 상기 1의 방법과 동일하게 하였다.

<51> 측정결과는 표 2에 나타내었다.

<52> 【표 2】

피토스핑고신 유도체의 농도(3-50 μ M)에 따른 세포생존율

	PS	PS-HCl	C6-PS	CLA-PS	NAPS	TAPS	C2-세라마이드
con	100 \pm 0.8	100 \pm 0.8	100 \pm 0.8	100 \pm 0.8	100 \pm 0.8	100 \pm 0.8	100 \pm 0.8
3 μ M	85 \pm 0.7	105 \pm 0.8	106 \pm 0.7	91 \pm 1.0	100 \pm 0.2	113 \pm 1.2	131 \pm 9.8
10 μ M	30 \pm 0.9	109 \pm 0.6	61 \pm 0.1	98 \pm 2.9	75 \pm 0.9	83 \pm 3.9	97 \pm 4.7
30 μ M	2 \pm 0.1	7 \pm 0.6	57 \pm 0.4	60 \pm 0.2	31 \pm 0.0	12 \pm 0.7	82 \pm 0.4
50 μ M	2 \pm 0.2	2 \pm 0.2	44 \pm 0.6	65 \pm 0.5	1 \pm 0.2	5 \pm 0.2	74 \pm 2.8

<53> 표 2에 나타난 바와 같이, 50 μ M에서 PS, PS-HCl, NAPS 및 TAPS는 95~98%의 세포독성을 나타낸 반면 C2-세라마이드는 26%의 세포독성을 나타내어 PS, PS-HCl, NAPS 및 TAPS가 C2-세라마이드 보다 69~72%의 우수한 세포독성효과가 있음을 알 수 있다.

<54> 3. 본 발명의 조성물이 사람 제대혈관내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cell; HUVEC)에서 세포독성에 미치는 영향

<55> 본 발명의 조성물이 사람 제대혈관내피세포에서 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 이용하여 관찰하였다.

<56> 세포배양 방법 및 MTT assay 방법은 상기 1의 방법과 동일하게 하였다.

<57> 측정결과는 표 3에 나타내었다.

<58> 【표 3】

피토스핑고신 유도체의 농도(3.5~50 μ M)에 따른 세포생존율

	PS	NAPS	TAPS	C2-세라마이드
con	100 \pm 0.6	100 \pm 8.5	100 \pm 0.1	100 \pm 5.7
3.5 μ M	64 \pm 4.7	66 \pm 7.5	47 \pm 8.4	90 \pm 1.6
7 μ M	19 \pm 1.8	51 \pm 0.5	22 \pm 1.9	60 \pm 7.7
15 μ M	14 \pm 0.9	19 \pm 3.4	15 \pm 0.7	61 \pm 8.4
30 μ M	13 \pm 1.0	14 \pm 0.6	9 \pm 0.5	34 \pm 2.3

<59> 표 3에 나타난 바와 같이, 30 μ M에서 PS, NAPS 및 TAPS는 86~91%의 세포독성을 나타낸 반면 C2-세라마이드는 66%의 세포독성을 나타내어 PS, NAPS 및 TAPS가 C2-세라마이드 보다 20~25%의 우수한 세포독성효과가 있음을 알 수 있다.

<60> 따라서, 피토스핑고신 유도체는 24시간 처치시 고농도에서 우수한 세포 독성을 나타냄을 알 수 있다.

<61> 실시예 2 : 아포토시스 유도 측정

<62> 피토스핑고신 유도체에 의한 HaCaT 세포의 아폽토시스 유도는 in situ cell death detection kit, POD(Enzo, 1684817, Boeringer Mannheim)를 이용하여 TUNEL assay(TUNEL-TdT-mediated dUTP nick end labeling- assay)로 관찰하였다.

<63> TC 챔버(Lab-TEK chamber Slide w/cover Permanox Slide sterile 1 well, 177410)에 HaCaT 세포를 1×10^6 의 개수로 접종하여 DMEM 배지에서 18시간 이상 배양한 후 피토스핑고신 유도체를 처리하였다. 약물 처리 후 24시간에 세포를 고정시킨 후 차단용액(blocking solution, 3% H_2O_2 in MeOH)으로 내인성 퍼옥시다제(oxidase)를 차단하고 투과용액(permeabilization solution, 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate)으로 세포의 투과(permeabilization)를 증대시킨 후 TUNEL 반응 혼합물(TUNEL reaction mixture)을 이용하여 아폽토틱 세포(apoptotic cells)를 라벨링(labeling) 시켰고 DAB 기질(DAKO, K3465)을 이용하여 발색시켰다. 발색된 세포는 현미경을 이용하여 관찰하였다.

<64> 측정 결과는 도 2와 도 3에 나타내었다.

<65> 도 2는 10 μM 과 30 μM 농도의 피토스핑고신 유도체를 24시간 처리하여 TUNEL assay를 실시한 결과를 나타낸 도이며, 피토스핑고신 유도체 모두 세포사멸을 일으켰고, 특히 NAPS와 TAPS가 가장 현저한 세포사멸 효과를 나타내었다.

<66> 도 3은 NAPS와 TAPS 30 μM 농도에서의 시간에 따른 아폽토시스 유도 효과를 나타낸 도이며, NAPS와 TAPS를 30 μM 농도로 처리한 후 4시간부터 아폽토시스가 유도됨을 알 수 있다.

<67> 실시예 3 : 본 발명의 조성물이 세포주기에 미치는 효과 및 아폽토시스와의 관계

<68> 1. 세포주기 관찰 1(Flow cytometric analysis)

<69> 주어진 시간대별로 세포를 트립신으로 처리하여 수거한 후 PBS로 세척하였다. 세포는 80% 에탄올을 이용하여 고정화시킨 다음 요오드화 프로피디움(propidium iodide)과 RNase를 첨가한 후 유동세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

<70> 결과는 도 4에 나타내었다.

<71> 도 4에 나타난 바와 같이, TAPS 처리후 12시간까지는 S 단계가 감소하고 상대적으로 G₂/M 단계가 증가하는 경향을 나타내었다. 이후 24시간 때까지 G₂/M 단계는 계속 감소하면서 상대적으로 sub G₁이 증가하는 경향을 나타내었다. Sub G₁은 아폽토틱 세포(apoptotic cells)를 나타내는 것으로 피토스펑고신 유도체에 의한 아폽토시스 유도가 24시간 때에 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다. 이러한 아폽토틱 세포의 증가는 동일 시간대에 그 분포가 감소하는 G₂/M 단계의 세포에서 유래되었다고 볼 수 있다. (24시간 때에 G₁단계의 증가는 아폽토틱 세포를 제외한 살아있는 세포만을 분석한 결과이다.)

<72> 2. 세포주기 관찰 2(면역형광법; Immunofluorescence)

<73> TAPS에 의한 아폽토시스 유도가 G₂/M단계 중 어느 단계로부터 유도되는 지를 조사하기 위하여 베타-튜불린(β -tubulin)을 이용하여 체세포분열(mitosis)을 관찰하였다.

<74> HaCaT 세포를 덮개유리(coverglass)가 놓인 디쉬에 배양한 후 TAPS(30 μ M)를 처리하였다. 시간대별로 세포를 PBS로 세척한 다음 5% 파라포름알데하이드

(paraformaldehyde)로 15분간 고정화시키고 베타-튜블린 항체(1:100)와 1시간동안 반응시켰다. PBS로 세척 후 Cy3-conjugated anti-mouse IgG로 2차 반응을 실시하였다. DNA 염색을 위해 0.3 μ g/ml의 DAPI(Sigma)를 첨가한 후 형광현미경을 이용하여 세포를 관찰하였다.

<75> 결과는 도 5에 나타내었다.

<76> 도 5에 나타난 바와 같이, TAPS 처리후 12시간 때보다 24시간 때 염색체(chromosome)가 응축(condense)된 체세포들(mitotic cells)이 더 많이 관찰되었다. 따라서, 체세포분열 중기에 아포토시스 기전이 일어남을 알 수 있다.

<77> 실시예 4 : 본 발명의 조성물과 Vit D₃ 또는 칼시포트리올(calcipotriol)과의 병용투여에 의한 세포독성의 상승효과

<78> 본 발명의 조성물과 Vit D₃ 및 칼시포트리올을 병용투여 하였을 때, 아포토시스에 대한 유도 효과를 확인하기 위하여 세포독성을 측정하였다.

<79> HaCaT 세포에 Vit D₃ 및 칼시포트리올을 1 μ M의 농도로, NAPS 및 TAPS를 각각 10 μ M의 농도로 단독 혹은 병용투여 하여 24시간에 MTT 분석법에 의하여 이들 약제가 단독 혹은 병용투여에 의해 세포독성에 미치는 효과를 관찰하였다.

<80> 결과는 표 4에 나타내었다.

<81> 【표 4】

	control	NAPS(10 μ M)	TAPS(10 μ M)	C2-세라마이트(10 μ M)
control	100 \pm 5	86 \pm 2	76 \pm 2	78 \pm 2
Vit D ₃ (1 μ M)	68 \pm 5	1 \pm 0.02	19 \pm 4	34 \pm 0
칼시포트리올(1 μ M)	74 \pm 3	42 \pm 4	28 \pm 3	60 \pm 4

<82> 표 4에 나타난 바와 같이, Vit D₃ 및 칼시포트리올을 1 μ M의 농도로 24 시간 투여 하였을 때는 각각 32% 및 26%의 독성을 나타냈다. NAPS 10 μ M 단독은 14%의 세포독성, TAPS 10 μ M 단독은 24%의 세포독성을 나타낸 반면, Vit D₃ 또는 칼시포트리올과 병용투여 하였을 때, NAPS의 경우 각각 99% 및 58% 이상의 세포독성 효과를 나타냈고, TAPS의 경우 각각 81% 및 72%의 세포독성효과를 나타내어, Vit D₃ 및 칼시포트리올 혹은 NAPS 및 TAPS 단독에 의한 세포독성 보다 동시 투여에 의해 세포독성 효과가 현저히 상승함을 관찰할 수 있었다.

<83> 실시예 5 : 본 발명의 조성물에 의한 아포토시스에 관여하는 유전자 및 단백질 확인

<84> 1. 유전자 확인

<85> 세포사멸에 관여하는 유전자를 알아내고자 TAPS를 30 μ M의 농도로 24시간 처리하여 mRNA를 분리한 후 apoptosis array kit를 이용하여 관찰하였다.

<86> Human Apoptosis Expression Array(R&D system, Minneapolis, MN)에서 제공하는 아포토시스-특이적 프라이머(apoptosis-specific primers)를 이용하여 labeled cDNA를 합성하고, 이것을 프로브(probe)로 하여 2 μ g의 총 RNA와 65℃에서 overnight 동안 항온 배양(incubation) 시킨 후 세척용액 I(0.5%SSPE, 1%(w/v) SDS)으로 상온에서 3차례, 세척용액 II(0.1% SSPE, 10% (w/v) SDS)로 65℃에서 1시간동안 세척하였다. 세척된 멤브레인(membrane)을 X-ray 필름에 노출시켜 -70℃에서 피폭시킨 후 현상하였다.

<87> 결과는 도 6에 나타내었다.

<88> 도 6에 나타난 바와 같이, 아포토시스 관련 유전자로는 COX-2 및 PIN 유전자의 발현이 증가하였고, 아포토시스 억제유전자인 서비빈 (survivin)이 감소하였으며, Bcl-2 관련 유전자인 Mcl-1과 Bcl-10이 증가하였다. 또한 사이토킨(cytokine) 중 IL-1 β 가 증가하였고, 세포주기 조절자(cell cycle regulator)인 p21은 증가한 반면, p53은 감소하였다.

<89> 2. 아포토시스 관련 단백질 확인

<90> 본 발명의 조성물이 아포토시스 유도에 관련된 카스파제-3, p53, Chk1 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 실시하였다.

<91> HaCaT 세포를 100-mm 디쉬에 배양한 후 시간대별로 수거하였다. 500 μ l RIPA lysis buffer(1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15 M SDS, 0.01 M sodium phosphate, pH 7.2, 2mM EDTA, 50mM sodium fluoride, 0.2mM sodium vanadate)를 첨가하여 단백질을 추출한 후 Bradford 방법을 이용하여 농도를 측정하였다.

<92> 추출된 단백질은 12% 폴리아크릴아미드겔(polyacrylamide gel)을 이용하여 전기영동을 실시한 후 니트로셀룰로즈 멤브레인(nitrocellulose membrane)으로 전이하였다. 5% non-fat milk로 차단(blocking)한 멤브레인을 1차 항체(primary antibody; 카스파제-3, p53, Chk1)와 반응시킨 다음, 멤브레인을 세척한 후 HRP-conjugated 2차 항체와 반응시켰다.

<93> ECL kit을 이용하여 단백질 강도(protein intensity)를 분석하였다.

- <94> 결과는 도 7, 도 8 및 도 9에 나타내었다.
- <95> 도 7에 나타난 바와 같이, 시간대별로 NAPS, TAPS 및 C2-세라마이드에 의한 카스파제-3 유도를 관찰한 결과, 카스파제-3는 NAPS 처리한 후 30분부터 현저히 증가되어 3시간에 최고 6배의 유도발현을 나타내었으며 증가발현된 카스파제-3는 12시간까지 유지된 후 24시간에 대조군 수준으로 떨어졌다.
- <96> 반면, TAPS는 NAPS에 비해 비교적 늦게 유도발현되기 시작하였으나 약처리 3시간에 최고 5배의 유도발현을 나타낸 후 24시간까지 유도발현이 지속되었다.
- <97> C2-세라마이드 역시 약처리 3시간에 카스파제-3를 최고 유도발현시켰으나 그 증가 배수는 NAPS 및 TAPS에 비해 현저히 약하였다(2.5배 증가).
- <98> 이러한 결과를 통해 피토스펑고신 유도체는 탁월한 아포토시스 유도능을 가지며, 아포토시스 유도에 관한 효능에 있어서 기존에 알려져 있는 C2-세라마이드에 비해 우수함을 알 수 있다.
- <99> 도 8 및 도 9에서 보는 바와 같이, p53과 Chk1 단백질은 8시간 때는 TAPS 처리에 의해 큰 변화가 없었지만, 아포토시스가 일어나는 24시간 때에는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 세라마이드에 의한 아포토시스 유도에 p53와 Chk1 경로(pathway)가 관여되고 있다는 것을 의미한다. 특히 Chk1은 DNA 손상에 의한 G₂/M 저지(arrest)에 관여하는 단백질임을 알 수 있다.

【발명의 효과】

- <100> 본 발명에 사용된 6종의 스펅고리피드 유도체중 NAPS 및 TAPS가 세포독성 및 아폽토시스 유도에 있어서 가장 탁월한 효과를 나타내며, 기존에 존재하는 C2-세라마이드 보다 우수한 효과가 있다.
- <101> 본 발명의 조성물은 생체내 아폽토시스 활성 유도에 의해 예방 또는 치료가 가능한 각종 피부질환, 각종 종양, 각종 암 등의 예방 또는 치료에 유용하다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

피토스핑고신(phytosphingosine, PS), 피토스핑고신-HCl(PS-HCl), C6-피토스핑고신(C6-PS), CLA-피토스핑고신(CLA-PS), 테트라아세틸 피토스핑고신(TAPS) 및 N-아세틸 피토스핑고신(NAPS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 피토스핑고신 유도체를 유효성분으로 함유하는 아폽토시스 유도용 약학 조성물

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 피토스핑고신 유도체는 TAPS 또는 NAPS인 것을 특징으로 하는 아폽토시스 유도용 약학 조성물

【청구항 3】

제 1항 내지 제 2항에 있어서, 비타민 D₃ 또는 칼시포트리올(calcipotriol)을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 아폽토시스 유도용 약학 조성물

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 생체내 아폽토시스 활성 유도에 의해 예방 또는 치료가 가능한 각종 피부질환, 각종 종양, 각종 암 등의 예방 또는 치료에 유용한 아폽토시스 유도용 약학 조성물

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 습진, 건선, 어린선 등과 같은 각질이상 질환; 아토피성 피부염, 피부염증, 소양증, 세균감염증, 여드름 또는 창상 등과 같은 피부질환; 자외선에 의해 유발되는 피부노화 및 피부질환; 전립선암, 피부암, 췌장암, 결장암, 흑색종, 난소암,

간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 자궁암, 유방암, 방광암, 뇌암, 신경세포종/신경교아세포종, 백혈병 등과 같은 많은 종류의 암 및 딱딱한 종양 등의 예방 또는 치료에 유용한 아폽토시스 유도용 약학 조성물

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 건선, 어린선 등과 같은 각질이상 질환, 자외선에 의해 유발되는 피부노화 및 피부질환의 예방 또는 치료에 유용한 아폽토시스 유도용 약학 조성물

【청구항 7】

제 5항에 있어서, 피부암의 예방 또는 치료에 유용한 아폽토시스 유도용 약학 조성물

【청구항 8】

피토스핑고신(phytosphingosine, PS), 피토스핑고신-HCl(PS-HCl), C6-피토스핑고신(C6-PS), CLA-피토스핑고신(CLA-PS), 테트라아세틸 피토스핑고신(TAPS) 및 N-아세틸 피토스핑고신(NAPS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 피토스핑고신 유도체를 유효성분으로 함유하는 아폽토시스 유도용 화장료 조성물

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 피토스핑고신 유도체는 TAPS 또는 NAPS인 것을 특징으로 하는 아폽토시스 유도용 화장료 조성물

【청구항 10】

제 8항 내지 제 9항에 있어서, 비타민 D₃ 또는 칼시포트리올(calcipotriol)을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 아폽토시스 유도용 화장료 조성물

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 생체내 아포토시스 활성 유도에 의해 예방 또는 치료가 가능한 각종 피부질환, 각종 종양, 각종 암 등의 예방 또는 치료에 유용한 아포토시스 유도용 화장료 조성물

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 습진, 건선, 어린선 등과 같은 각질이상 질환; 아토피성 피부염, 피부염증, 소양증, 세균감염증, 여드름 또는 창상 등과 같은 피부질환; 자외선에 의해 유발되는 피부노화 및 피부질환; 전립선암, 피부암, 췌장암, 결장암, 흑색종, 난소암, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 자궁암, 유방암, 방광암, 뇌암, 신경세포종/신경교아세포종, 백혈병 등과 같은 많은 종류의 암 및 딱딱한 종양 등의 예방 또는 치료에 유용한 아포토시스 유도용 화장료 조성물

【청구항 13】

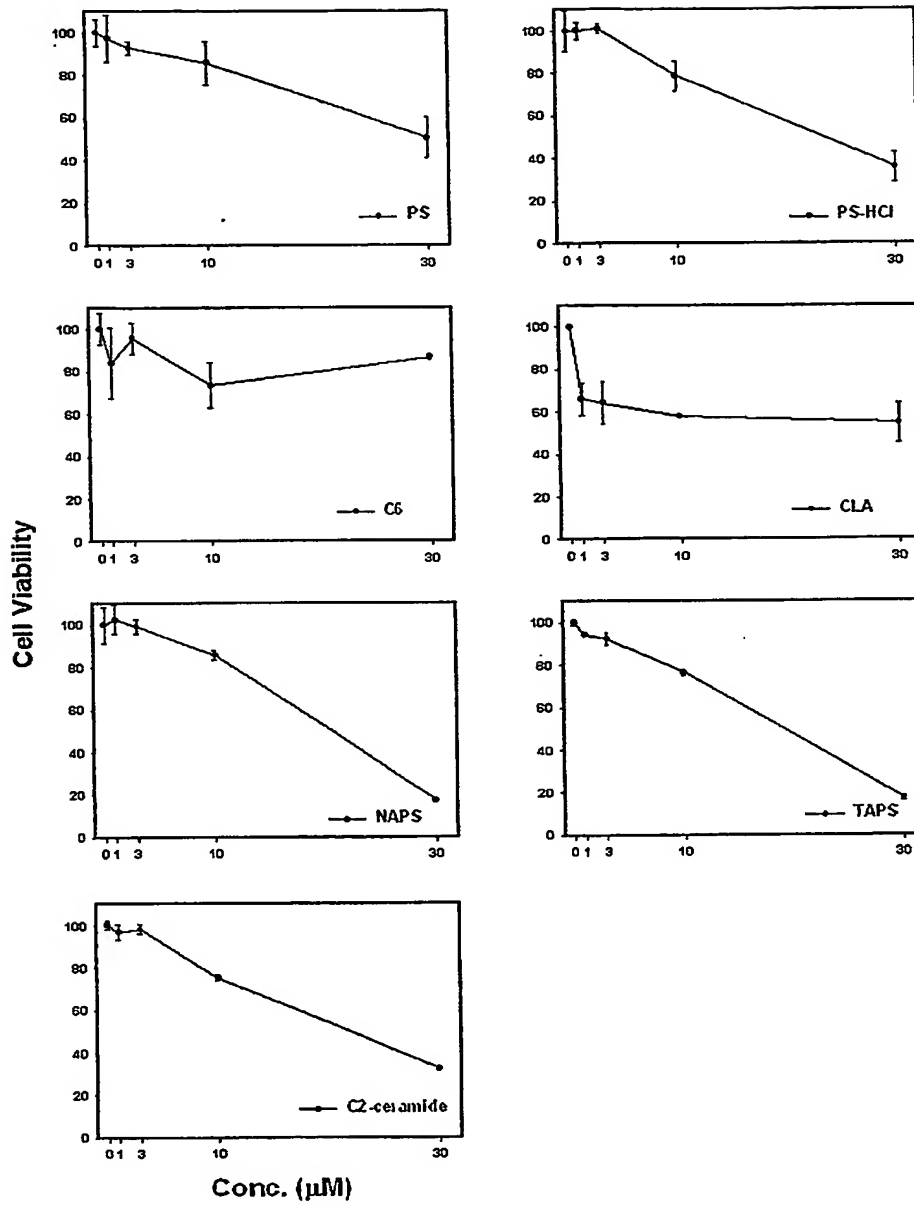
제 12항에 있어서, 건선, 어린선 등과 같은 각질이상 질환, 자외선에 의해 유발되는 피부노화 및 피부질환의 예방 또는 치료에 유용한 아포토시스 유도용 화장료 조성물

【청구항 14】

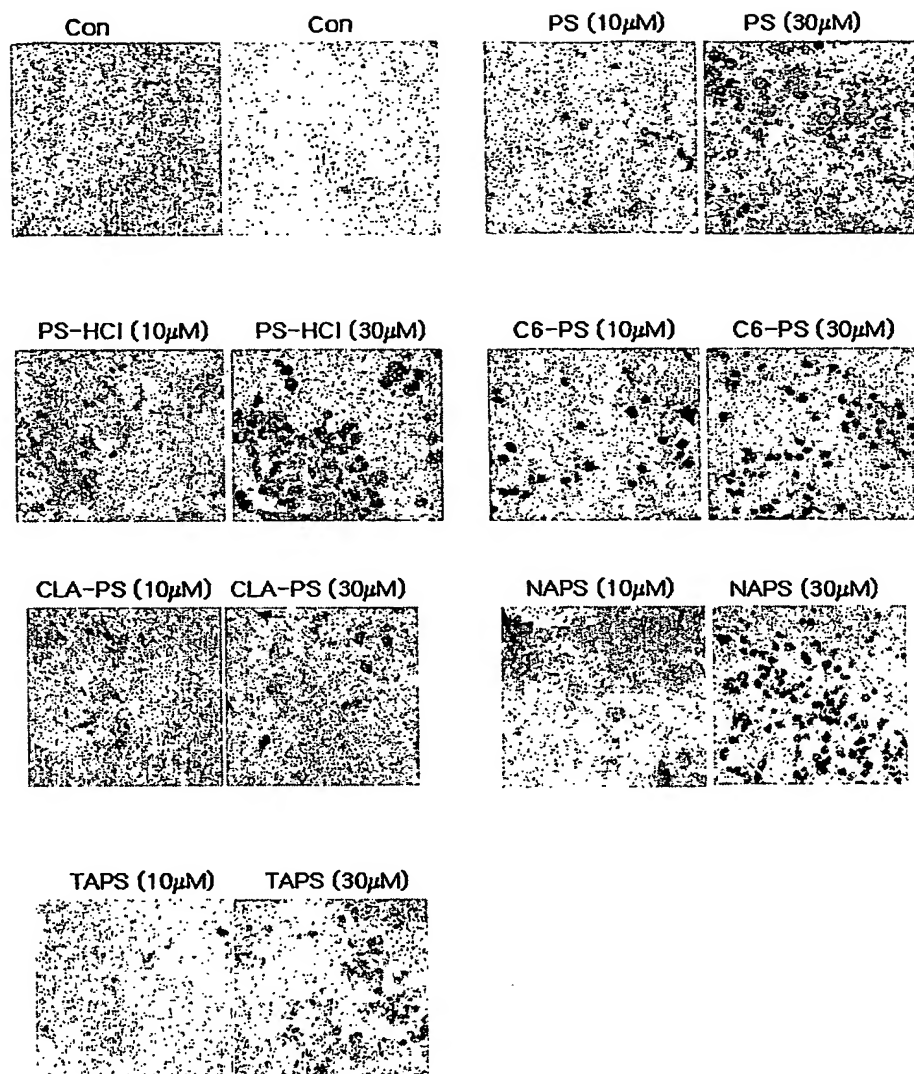
제 12항에 있어서, 피부암의 예방 또는 치료에 유용한 아포토시스 유도용 화장료 조성물

【도면】

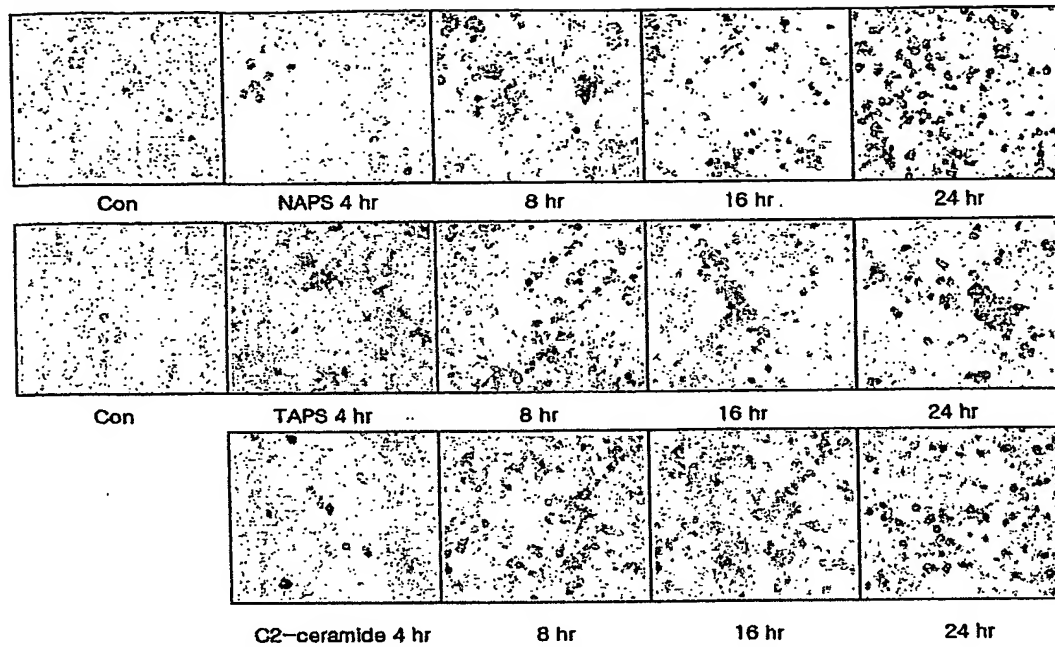
【도 1】



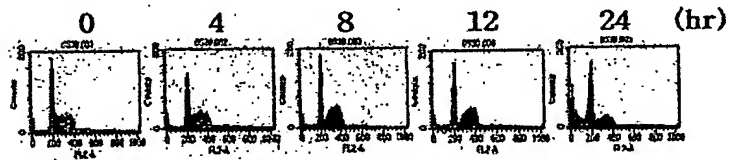
【도 2】



【도 3】

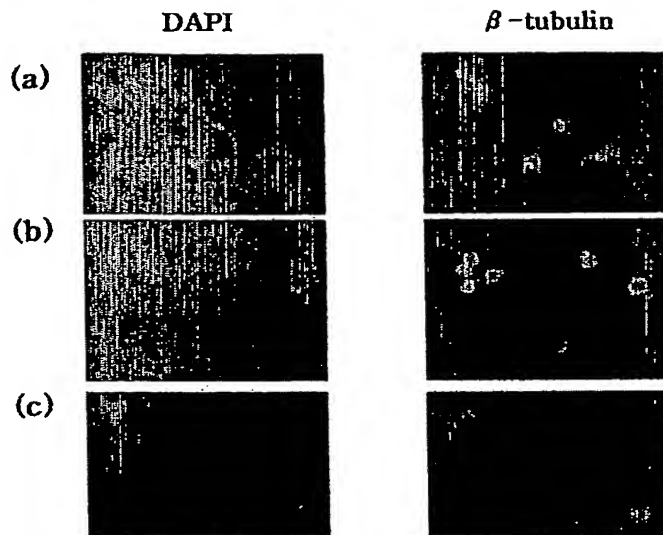


【도 4】

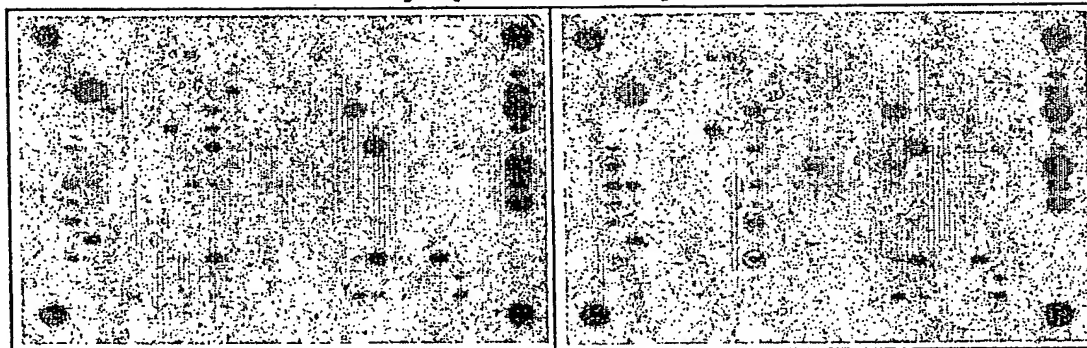


Time(h)	Cells in phase(% of total)		
	G ₁	S	G ₂ /M
0	31.85	63.07	5.08
4	29.17	66.26	4.58
8	34.84	47.37	17.79
12	36.97	38.65	24.38
24	56.40	24.38	16.85

【도 5】



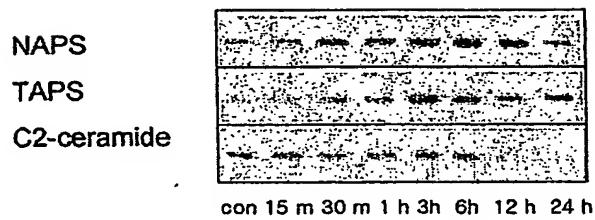
【도 6】

Apoptosis Array**Control****TAPS**

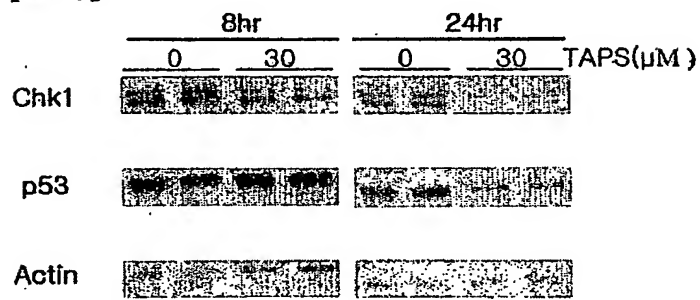
COX-2 (Apoptosis related)	p16 (Cell Cycle Regulator)	p100/NF- κ B2 (Signal Transduction Factor)
PIN (Apoptosis related)	p21 (Cell Cycle Regulator)	ref-1 (Signal Transduction Factor)
Survivin (Apoptosis Suppressor)	p53 (Cell Cycle Regulator)	TRAIL (TNF-super family)
MCI-1 (BCI-2 related)	RbAp48 (Cell Cycle Regulator)	
PARP (Caspase related)	IL-1 β (Cytokine)	
c-myc (Cell Cycle Regulator)	IL-6 (Cytokine)	
Cyclin A2 (Cell Cycle Regulator)	BCI-10 (Signal Transduction Factor)	

【도 7】

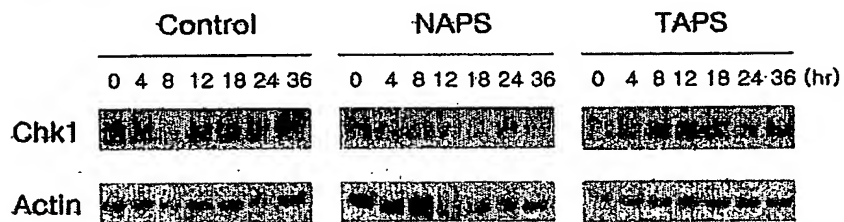
Caspase-3 induction by NAPS, TAPS and C2-ceramide



【도 8】



【도 9】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.